

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
21. März 2002 (21.03.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/22842 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12P 9/00 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/10729
- (22) Internationales Anmeldedatum: 17. September 2001 (17.09.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 100 46 039.9 18. September 2000 (18.09.2000) DE
- (71) Anmelder: BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE). Veröffentlicht: — mit internationalem Recherchenbericht — vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen
- (72) Erfinder: FRIEDRICH, Thomas; Ahornstrasse 9, 63322 Rödermark (DE).
- (74) Anwalt: ISENBRUCK, Günter; Bardehle-Pagenberg-Dost-Altenburg-Geissler-Isenbru, ck Theodor-Heuss-Anlage 12, 68165 Mannheim (DE). Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: POLYCONDENSATION OF ORGANIC SILICON COMPOUNDS

(54) Bezeichnung: POLYKONDENSATION VON ORGANISCHEN SILICIUMVERBINDUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for the polycondensation of organic silicon compounds at pH values between 6 and 8 in the presence of a lipase, said lipase being optionally immobilised on a carrier consisting of polymer materials. Suitable polycondensable organic silicon compounds are (RO)(R¹O)(R²O)(R³O)Si, (RO)(R¹O)(R²O)(R³O)SiR³, (RO)(R¹O)Si(R²)(R³) and (RO)SiR¹R²R³ with R, R¹, R² and R³ independently representing C₁- to C₁₀-alkyl, C₃- to C₁₀-cycloalkyl, C₄- to C₂₀-alkylcycloalkyl, aryl, C₆- to C₁₆-alkylaryl, the alkyl groups being linear or branched. It is advantageous that the lipase can be obtained relatively easily by means of large-scale fermentation processes. Lipases from *Pseudomonas* species are preferable.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Polykondensation von organischen Siliciumverbindungen bei pH-Werten zwischen 6 und 8 in Gegenwart einer Lipase, die gegebenenfalls auf einem Träger aus Polymermaterialien immobilisiert ist. Geeignete polykondensierbare organische Siliciumverbindungen sind (RO)(R¹O)(R²O)(R³O)Si, (RO)(R¹O)(R²O)(R³O)SiR³, (RO)(R¹O)Si(R²)(R³) und (RO)SiR¹R²R³ mit R, R¹, R² und R³, die unabhängig voneinander C₁- bis C₁₀-Alkyl, C₃- bis C₁₀-Cycloalkyl, C₄- bis C₂₀-Alkylcycloalkyl, Aryl, C₆- bis C₁₆-Alkylaryl sind, wobei die Alkylgruppen linear oder verzweigt sein können. Vorteilhaft ist, dass die Lipase relativ leicht über Fermentationsprozesse in grossem Massstab gewonnen werden kann. Bevorzugt werden Lipasen aus *Pseudomonas*-Arten eingesetzt.

WO 02/22842 A1

Polykondensation von organischen Siliciumverbindungen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Polykondensation von organischen Siliciumverbindungen in Gegenwart eines Enzyms.

Silicone und Silikate besitzen großtechnische Bedeutung. Silikate werden beispielsweise als Phasenmaterial in der Chromatographie eingesetzt. Es gibt zahlreiche Verfahren zu ihrer Herstellung. Verfahren, die zu amorphen Silikaten führen, gehen beispielsweise aus von Orthokieselsäure, welche unter Säure- oder Basenkatalyse in wäßriger Lösung kondensiert wird (A. F. Holleman, E. Wiberg, Lehrbuch der Anorganischen Chemie, Walter de Gruyter Verlag, Berlin New York 1985, 91. – 100. Auflage, S. 757 – 764). Silicone lassen sich durch Kondensation von Silanolen, Silandiolen und Silantriolen darstellen (A. F. Holleman, E. Wiberg, Lehrbuch der Anorganischen Chemie, Walter de Gruyter Verlag, Berlin New York 1985, 91. – 100. Auflage, S. 786 – 788). In den letzten Jahren wurden neue Verfahren entwickelt, bei denen organische Siliciumverbindungen bei milden Bedingungen kondensiert werden können. Als Katalysatoren werden Enzyme eingesetzt. Die Reaktionen lassen sich bei pH-Werten zwischen 6 und 8 durchführen. Ein geeignetes Enzym wurde 1998 erstmalig aus einem marinen Schwamm isoliert, wie in J. N. Cha, K. Shimizu, Y. Zhou, S. C. Christiansen, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, D. E. Morse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96, 361-365 beschrieben. Das Enzym ist aus drei Untereinheiten, den sog. Silicateinen, aufgebaut. Die Gewinnung des Enzyms ist relativ aufwendig. Neben der Polykondensation in Pufferlösung wurden die organischen Siliciumverbindungen $(\text{EtO})_4\text{Si}$ und $(\text{EtO})_3\text{SiPh}$ auch direkt mit luftgetrocknetem Enzym umgesetzt. WO 00/35993 beschreibt darüber hinaus den Einsatz von synthetischen Homopolymeren aus Cystein und Blockpolypeptiden aus Lysin und Cystein zur

Polykondensation von Siliciumalkoxiden, Metallalkoxiden und deren Derivaten zu Silikaten, Polysiloxanen und Polymetalloxanen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein weiteres Verfahren zur Polykondensation von organischen Siliciumverbindungen zur Verfügung zu stellen, welches bei pH-Werten zwischen 6 und 8 durchführbar ist, sowie einen geeigneten Katalysator für diese Reaktion zu finden.

Die Lösung der Aufgabe geht aus von dem bekannten Verfahren zur Polykondensation von organischen Siliciumverbindungen in Lösung bei pH-Werten zwischen 6 und 8 in Gegenwart eines Enzyms. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß als Enzym eine Lipase eingesetzt wird. Dies ist überraschend, weil Lipasen keinerlei strukturelle Ähnlichkeit zu bereits eingesetzten Enzymen wie Silicateinen aufweisen.

Für das erfindungsgemäße Verfahren sind im allgemeinen alle Lipasen geeignet, bevorzugt sind Lipasen aus *Pseudomonas*-Arten, besonders bevorzugt sind die Lipase aus *Burkholderia plantarii* (EC 3.1.1.3; SWISS-PROT: Q05489; L. G. J. Frenken, M. R. Egmond, A. M. Batenburg, J. W. Bos, C. Visser, C. T. Verrips, Appl. Environ. Microbiol. 1992, 58, 3787 – 3791), die Lipase A aus *Burkholderia cepacia* (EC 3.1.1.3; SWISS-PROT: P22088; S. Joergensen, K. W. Skov, B. Diderichsen, J. Bacteriol. 1991, 173, 559 – 567) und die Lipase A aus *Pseudomonas aeruginosa* (EC 3.1.1.3; SWISS-PROT: P26876; S. Wohlfarth, C. Hoesche, C. Strunk, U. K. Winkler, J. Gen. Microbiol. 1992, 138, 1325 – 1335), ganz besonders bevorzugt ist die Lipase aus *Burkholderia plantarii* geeignet.

Vorteilhaft ist, daß Lipasen über Fermentationsprozesse in großem Maßstab gewonnen werden können. Beispielsweise kann eine Lipase aus einem Bakterium dadurch gewonnen werden, daß das Bakterium, das die gewünschte Lipase sezerniert, in einem Nährmedium enthaltend Hefe-Extrakt, Sojaöl und übliche Zusatzstoffe wie Mineralsalze und Spurenelemente sowie gegebenenfalls Puffersubstanzen fermentiert wird. Nach Beendigung der Fermentation kann die Lipase von den Bakterienzellen und Zellbestandteilen z.B. durch Zentrifugation oder Filtration abgetrennt und durch Verfahren wie Ionenaustauschchromatographie, Molekularsiebchromatographie, hydrophobe Chromatographie und

Fällungsmethoden gereinigt werden. Eine Reinigung der Lipase kann entfallen, wenn die Lipase nach Abtrennung von den Bakterienzellen und Zellbestandteilen an Trägern wie Polyolefinpartikeln und Polyurethanschaumstoffen immobilisiert wird. Immobilisierung bedeutet, daß Enzyme aus wasserfreien oder wäßrigen Lösungen insbesondere an unpolaren Matrices mit großer Oberfläche dauerhaft unter Beibehaltung der katalytischen Aktivität gebunden werden. Die Immobilisierung reduziert den Verlust an Lipase bei der Aufarbeitung und erlaubt die Durchführung der Polykondensation von organischen Siliciumverbindungen auch in organischen Lösungsmitteln, in denen freie Lipase nicht löslich ist. Zudem können die Polykondensationsprodukte auf dem Träger aufwachsen, so daß sich daraus neue Anwendungen in der Herstellung von Bauteilen in der Mikroelektronik ergeben können.

Werden Polyurethanschaumstoffe als Träger eingesetzt, werden die Enzyme auf dem Träger immobilisiert, indem die Enzyme mit reaktiven Gruppen an der Oberfläche des Polyurethanschaumstoffes reagieren. Die Enzyme werden kovalent an die Oberfläche gebunden. Solche reaktiven Gruppen können NCO-Gruppen, Epoxidgruppen, CO_2H -gruppen und/oder phenolische OH-Gruppen sein, die gegebenenfalls erst nach der Polymerisation an der Oberfläche des Polyurethanschaumstoffes angebracht wurden.

Werden Polyolefinpartikel als Träger eingesetzt, beruht die Bindung zwischen Enzym und Träger u.a. auf hydrophoben Wechselwirkungen. Als Polyolefine kommen Homo- und Copolymere aus gegebenenfalls substituierten Olefinen wie Ethylen, Propylen, Butadien, Buten, Octen oder Styrol in Betracht; bevorzugt wird Polypropylen als Träger eingesetzt.

Die Immobilisierung von Lipasen, die in durch Fermentation von Bakterien erhaltenen Lösungen, sog. Fermenterlösungen, vorliegen, auf Polyolefinpartikel wird im allgemeinen folgendermaßen durchgeführt: Die Bakterienzellen und Zellbestandteile werden aus der Fermenterlösung abgetrennt, z.B. durch Zentrifugation. Die zurückbleibende Lösung wird mit Wasser verdünnt, und die Polyolefinpartikel werden in Kontakt mit dieser Lipase enthaltenden Lösung gebracht. Das Inkontaktbringen erfolgt beispielsweise durch Zugabe der Polyolefinpartikel zur Lipase enthaltenden Lösung. Bei Inkontaktbringen der Lipase enthaltenden Lösung mit den Polyolefinpartikeln wird die Lipase an die Polyolefinpartikel

adsorbiert. Die Polyolefinpartikel weisen eine sehr hohe Selektivität gegenüber Lipasen auf. Es werden überwiegend nur die Lipase und gegebenenfalls ihre Bruchstücke an die Polyolefinpartikel adsorbiert. Der Anteil an anderen Proteinen, der aus der Lipase enthaltenden Lösung an die Polyolefinpartikel adsorbiert wird, liegt im allgemeinen unter 2 Gew.-%. Die Adsorption stellt somit gleichzeitig einen Reinigungsschritt der Lipase von den weiteren Proteinen und Enzymen der Lipase enthaltenden Lösung dar.

Die Teilchengröße und der Hohlraumanteil der Polyolefinpartikel ist nicht kritisch. Bevorzugte Polyolefinpartikel weisen eine Teilchengröße von 100 µm bis 2000 µm, besonders bevorzugte Polyolefinpartikel weisen eine Teilchengröße von 200 µm bis 1000 µm auf. Der Hohlraumanteil der Polyolefinpartikel beträgt bevorzugt 40% bis 80%, besonders bevorzugt 60% bis 70%, ganz besonders bevorzugt 65%. Die Porengröße der Polyolefinpartikel beträgt vorzugsweise 0.01 µm bis 1 µm, besonders bevorzugt 0.05 bis 0.5 µm.

In einer Ausführungsform der Erfindung werden als Träger Polypropylenträger Accurel® der Firma Akzo mit den Korngrößen < 400 µm (Accurel 1004), 400 bis 1000 µm (Accurel 1001) und > 1000 µm (in Form von Pellets) eingesetzt, bevorzugt werden Accurel 1004 und Accurel 1001 eingesetzt.

Die optimale Dauer der Immobilisierung von Lipase auf Polyolefinpartikel hängt von der Lipase und der Art der Polyolefinpartikel ab und kann durch Routineversuche bestimmt werden. Im allgemeinen dauert die Immobilisierung 10 min bis 24 h, bevorzugt 4 bis 24 h, besonders bevorzugt 4 bis 6 h.

Im allgemeinen erfolgt die Immobilisierung bei einem pH-Wert zwischen 4.0 und 8.8, bevorzugt zwischen 4.5 und 7.8, besonders bevorzugt zwischen 4.5 und 6.0.

Die Ionenstärke, die durch Leitfähigkeitsmessung bestimmt werden kann, soll im allgemeinen < 0.5 M, bevorzugt < 0.3 M betragen.

Die Immobilisierung der Lipase auf den Polyolefinpartikeln wird auch als Beladung der Polyolefinpartikel mit Lipase bezeichnet. Eine bevorzugte Beladung, bei der möglichst viel Lipase adsorbiert wird und möglichst wenig Lipase in der Lösung verbleibt, ist von der Art des Polyolefins abhängig und kann über Routineversuche ermittelt werden. Im allgemeinen
5 liegt die Menge an Lipase, die auf Polyolefinpartikeln immobilisiert wird, zwischen 0.1 und 50 mg Lipase pro g Träger, bevorzugt zwischen 0.5 und 20 mg Lipase pro g Träger, besonders bevorzugt zwischen 2 und 6 mg Lipase pro g Träger. In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung liegt sie bei 4.2 mg Lipase pro g Träger.

10 Vorteilhafterweise wird die immobilisierte Lipase vor der Verwendung als Katalysator durch Waschen mit einem geeigneten Lösungsmittel wie Wasser von nicht adsorbiertem Material gereinigt. Anschließend wird sie gegebenenfalls an der Luft getrocknet. Die Restfeuchte beträgt im allgemeinen weniger als 4%.

15 Das beschriebene Verfahren zur Immobilisierung von Lipasen auf Polyolefinpartikel ist nicht nur mit Lipasen durchführbar, die in durch Fermentation erhaltenen Lösungen vorliegen, sondern generell mit Lipasen, die in wäßriger oder organischen Lösungsmitteln (beispielsweise in halogenierten oder nicht halogenierten aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoffe) oder in wäßriger Pufferlösung vorliegen. Das Verfahren kann auch
20 mit vor der Immobilisierung aufgereinigten Lipasen durchgeführt werden, eine Aufreinigung ist jedoch nicht nötig. Andere, dem Fachmann bekannte Verfahren zur Immobilisierung von Lipasen können ebenfalls angewendet werden.

Die immobilisierte Lipase kann ebenso wie die freie Lipase als Katalysator zur
25 Polykondensation von organischen Siliciumverbindungen eingesetzt werden. Gegenüber der freien Lipase zeichnet sich immobilisierte Lipase durch eine erhöhte Stabilität und Standzeit unter kontinuierlicher und diskontinuierlicher Reaktionsführung sowie durch eine leichte Rückgewinnung der katalytisch aktiven Spezies bei diskontinuierlichen Reaktionsansätzen aus.

30

Für das erfindungsgemäßen Verfahren geeignete polykondensierbare organische Siliciumverbindungen sind

- $(\text{RO})(\text{R}^1\text{O})(\text{R}^2\text{O})(\text{R}^3\text{O})\text{Si}$, wobei R, R^1 , R^2 und R^3 unabhängig voneinander C_1 - bis C_{10} -Alkyl, C_3 - bis C_{10} -Cycloalkyl, C_4 - bis C_{20} -Alkylcycloalkyl, Aryl, C_6 - bis C_{16} -Alkylaryl bedeuten können und die Alkylgruppen linear oder verzweigt sein können.

5

- $(\text{RO})(\text{R}^1\text{O})(\text{R}^2\text{O})\text{SiR}^3$, wobei R, R^1 , R^2 und R^3 unabhängig voneinander C_1 - bis C_{10} -Alkyl, C_3 - bis C_{10} -Cycloalkyl, C_4 - bis C_{20} -Alkylcycloalkyl, Aryl, C_6 - bis C_{16} -Alkylaryl bedeuten können und die Alkylgruppen linear oder verzweigt sein können.

10 - $(\text{RO})(\text{R}^1\text{O})\text{Si}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$, wobei R, R^1 , R^2 und R^3 unabhängig voneinander C_1 - bis C_{10} -Alkyl, C_3 - bis C_{10} -Cycloalkyl, C_4 - bis C_{20} -Alkylcycloalkyl, Aryl, C_6 - bis C_{16} -Alkylaryl bedeuten können und die Alkylgruppen linear oder verzweigt sein können.

- $(\text{RO})\text{SiR}^1\text{R}^2\text{R}^3$, wobei R, R^1 , R^2 und R^3 unabhängig voneinander C_1 - bis C_{10} -Alkyl, C_3 - bis C_{10} -Cycloalkyl, C_4 - bis C_{20} -Alkylcycloalkyl, Aryl, C_6 - bis C_{16} -Alkylaryl bedeuten können und die Alkylgruppen linear oder verzweigt sein können.

Bevorzugt ist der Einsatz von Tetraalkoxysilanen $(\text{RO})_4\text{Si}$ und Trialkoxyarylsilanen $(\text{R}^1\text{O})_3\text{SiR}^2$ mit R, $\text{R}^1 = \text{Me, Et, Pr, } i\text{Pr, Bu}$ und $\text{R}^2 = \text{Aryl}$. Die Umsetzung von Silanen mit
20 Arylgruppen bietet den Vorteil, daß die Arylgruppen Licht im UV-Bereich absorbieren und daher solche Silane mit UV-Detektoren nachweisbar sind.

Setzt man Tetraalkoxysilane und Trialkoxyalkylsilane zur Polykondensation ein, so können je nach Reaktionsführung lineare, verzweigte und vernetzte Silikate mit Hydroxy-,
25 Alkoxy-, Alkyl-, Cycloalkyl-, Alkylcycloalkyl-, Aryl- und Alkylarylresten an der Oberfläche erhalten werden.

Die Polykondensation von Dialkoxydialkylsilanen führt zu Siliconen.

30 Setzt man Dialkoxydialkylsilane und Alkoxytrialkylsilane bei der Polykondensation von Tetraalkoxysilanen ein, so können diese als Regler dienen und die Molmasse der entstehenden Oligo- und Polysilikate reduzieren.

Wird freie oder immobilisierte Lipase eingesetzt, so kann als Lösungsmittel Wasser oder eine Pufferlösung eingesetzt werden, in denen die Lipase gut löslich ist. Die Pufferlösungen lassen sich durch Lösen von Puffersubstanzen in Wasser herstellen. Als
5 Puffersubstanzen kommen als sog. Good'schen Puffer bekannte organische Puffersubstanzen in Betracht. Bevorzugt sind Puffersubstanzen, die Amino-Gruppen enthalten, besonders bevorzugt ist Trishydroxymethylaminomethan (sog. TRIS-Puffer). Weitere geeignete Puffersubstanzen, die in dem Bereich zwischen pH 6.5 und pH 7.4 puffern, können den Standard-Nachschlagewerken entnommen werden.

10

Die Ionenstärke der eingesetzten Pufferlösungen liegt im allgemeinen zwischen 1 mM und 100 mM, bevorzugt zwischen 5 mM und 50 mM, besonders bevorzugt zwischen 10 mM und 20 mM. Bei höheren Ionenstärken als 100 mM kann eine unkontrollierte Polykondensation der organischen Siliciumverbindungen ausgelöst werden. Beispielsweise
15 können Phosphatpufferlösungen wie $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ -Puffer, die im Bereich um pH 7 puffern, in einer Ionenstärke von über 100 mM mit den eingesetzten organischen Siliciumverbindungen reagieren.

Da die organischen Siliciumverbindungen in Wasser oder verdünnten wäßrigen
20 Pufferlösungen schlecht löslich sind, ist eine gute Durchmischung der Reaktionslösung erforderlich.

Wird immobilisierte Lipase eingesetzt, so können auch organische Lösungsmittel wie höhere Alkohole mit bis zu acht C-Atomen, aliphatische und aromatische
25 Kohlenwasserstoffe sowie Ether eingesetzt werden. Beispiele sind Methyl-tert-butylether, Cyclohexan und Cyclohexanol. Da die organischen Siliciumverbindungen in diesen Lösungsmitteln besser löslich sind als in Wasser, verläuft die Reaktion im allgemeinen in organischen Lösungsmitteln schneller als in wäßriger Lösung. Die Lösung in organischen Lösungsmitteln muß noch eine Restmenge an Wasser enthalten, die mindestens äquimolar
30 den im Reaktionsansatz vorhandenen Alkoxygruppen ist, um eine Hydrolyse der Alkoxygruppen und damit eine Polykondensation zu ermöglichen.

Die Polykondensation wird im allgemeinen bei einem pH-Wert zwischen 6 und 8 durchgeführt, bevorzugt bei einem pH-Wert zwischen 6.5 und 7.4, besonders bevorzugt bei einem pH-Wert zwischen 6.8 und 7.2.

- 5 Im allgemeinen ist die Reaktion bei Temperaturen zwischen 0 und 60°C durchführbar, bevorzugt zwischen 10 und 40°C, besonders bevorzugt zwischen 20 und 30°C.

Die Reaktion kann sowohl bei Normaldruck als auch erhöhtem Druck von bis zu 2 bar durchgeführt werden, bevorzugt wird sie jedoch bei Normaldruck durchgeführt.

10

Die Reaktionsdauer beträgt im allgemeinen 1 h bis 24 h.

- In einer Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Reaktionsdurchführung durch Zugabe der organischen Siliciumverbindung zu der Lipase enthaltenden Lösung unter Rühren. In
15 einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird die organische Siliciumverbindung vorgelegt und die Lipase enthaltende Lösung unter Rühren zugeben. Die Zugabe der Reaktanden kann sowohl kontinuierlich als auch diskontinuierlich erfolgen, bevorzugt erfolgt sie diskontinuierlich.

- 20 Die organische Siliciumverbindung kann sowohl rein als auch in den oben genannten organischen Lösungsmitteln gelöst zugegeben werden.

- Beim Einsatz von freier Lipase in Wasser und/oder Puffersubstanzen enthaltenden Lösungen entsteht im allgemeinen beim Zusammengeben von Lipase enthaltender Lösung
25 und organischer Siliciumverbindung eine Emulsion. Wird immobilisierte Lipase eingesetzt, so entsteht eine Suspension. Das Produkt fällt meist in Form eines Niederschlages an.

- Die Menge an eingesetzter Lipase wird angegeben in Units [U] pro ml Lösungsmittel. Die
30 Aktivität der Lipase in wässriger Lösung bei 20 bis 23°C wird durch Umsetzung des Substrats Tributyrin (= Glyceryltris(butanoat)) bestimmt, welches durch die Lipase in

Glycerin und Buttersäure gespalten wird. Die Konzentration an Buttersäure läßt sich durch Titration mit NaOH (1N) bestimmen. Damit ergibt sich

$$1 \text{ U} = \text{Umsatz an Substrat } [\mu\text{mol}] \frac{1}{\text{Zeit}[\text{min}]}$$

- 5 Die Aktivität der Lipase ändert sich zwischen 15°C und 30°C nicht. 8.3 mg Lipase weisen beispielsweise eine Aktivität von 250000 Units auf.

Das Mengenverhältnis von freier Lipase, angegeben in Units pro ml H₂O, zu organischer Siliciumverbindung, angegeben in mol, liegt im allgemeinen zwischen 200 bis 5000 Units
10 pro ml H₂O und 4 mmol organischer Siliciumverbindung und bevorzugt zwischen 400 bis 2000 Units pro ml H₂O und 4 mmol organischer Siliciumverbindung.

Das Mengenverhältnis von immobilisierter Lipase, angegeben in Units, zu organischer Siliciumverbindung, angegeben in mol, liegt zwischen 100 bis 20 000 Units pro 4 mmol
15 organischer Siliciumverbindung, bevorzugt zwischen 100 bis 10 000 Units pro 4 mmol organischer Siliciumverbindung, in z.B. 1 ml H₂O als Lösungsmittel.

Die Aufarbeitung erfolgt beim Einsatz von freier Lipase im allgemeinen durch Abtrennung der organisch-wäßrigen Phase und gegebenenfalls der organischen Phase von dem Produkt
20 enthaltenden Niederschlag, bevorzugt durch Zentrifugieren. Anschließend wird der Niederschlag gegen ein organisches Lösungsmittel dialysiert. Als Lösungsmittel kommen alle mit Wasser mischbaren Alkohole wie beispielsweise MeOH, EtOH, *i*PrOH und *n*PrOH in Betracht. Bevorzugt wird EtOH verwendet.

25 Die Abtrennung des Reaktionsproduktes kann auch durch Molekularsiebchromatographie, sowie – bei genügend hohen Molmassen – durch Zentrifugation, oder – bei genügend hydrophoben Reaktionsprodukten – durch Extraktion mit einem unpolaren Lösungsmittel erfolgen.

30 Die Lipase, die sich in der organisch-wäßrigen Phase befindet, kann zurückgewonnen werden, z.B. durch Ultrafiltration und Chromatographie.

Wird immobilisierte Lipase verwendet, so wachsen die Silicate auf dem Träger auf. Die Abtrennung des Reaktionsproduktes von der Lösung, in der die Reaktion stattfand, kann durch Filtration erfolgen.

5

Die Bestimmung der Molmasse des Produkts erfolgt in der Regel durch Gelpermeationschromatographie. Die Molmasse kann jedoch auch durch massenspektrometrische Methoden wie MALDI-MS (MALDI = matrix assisted laser desorption ionisation) oder ESI-MS (ESI = electrospray ionisation) bestimmt werden.

10

Die Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele näher erläutert.

Beispiele:

15

Beispiel 1: Fermentation der Lipase aus *Burkholderia plantarii*

Von einer Vorkultur, enthaltend 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,5 g KH_2PO_4 , 3,5 g K_2HPO_4 , 5,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,02 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 10 g Hefe-Extrakt (Firma Difco) pro 1 l Wasser, wurden jeweils 200 ml in einem 1 l Schüttelkolben mit 2 Bodenschikanen für 30 min bei 121°C sterilisiert und mit üblichen Zusatzstoffen (Spurenelementen) versetzt.

20

Der Inhalt von zwei dieser Schüttelkolben, also 400 ml, wurde mit einer Ampulle *Burkholderia plantarii* 9 Stunden bei 30°C inkubiert, und so eine Vorkultur erhalten.

25

Ein Medium enthaltend 110 g Hefe-Extract (Difco), 38,5 g K_2HPO_4 , 38,5 g KH_2PO_4 , 55 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 11 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,22 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, das auf 1 l mit vollentsalztem

Wasser aufgefüllt wurde, wurde 30 min bei 121 °C sterilisiert und mit üblichen Zusatzstoffen (Spurenelementen) versetzt. Dieses Medium wurde anschließend in einen 14 l Fermenter gegeben.

30

Die Fermentation wurde bei 30°C, einem pH-Wert von 6,5 und einer Drehzahl von 1000 Umdrehungen pro Minute bei einer Begasung von 11 l O₂ pro min drei Tage lang durchgeführt. Während der Fermentation wurde kontinuierlich Sojaöl zugegeben. Die Zugabegeschwindigkeit wurde gemäß Formel I berechnet. Eine halbe Stunde nach Beginn
5 der Reaktion wurde die Vorkultur zugegeben.

$$S = V * SF * (e^{(ST * t)} - 1)/t \quad \text{(Formel I)}$$

S = Dosiermenge [g/h],

10 V = Fermentationsvolumen [l],

SF = 110 [g/lh],

ST = 0,01 [1/h],

t = Zeit seit Start [h]

15 Die Lipase wurde von dem Organismus in das umgebende Medium sezerniert. Nach Ende der Fermentation und Abkühlen auf 15 °C wurde die Lösung abgelassen. Die Lipase-Aktivität betrug 8900 U/ml, durch Zentrifugation konnte dieser Wert auf 10500 U/ml erhöht werden.

20

Beispiel 2: Immobilisierung

Die durch die oben beschriebene Fermentation erhaltene Fermenterlösung wurde bei 5000 bis 6000 Umdrehungen pro Minute in der swing-out Zentrifuge RC-3B in 1 l-Gefäßen
25 abzentrifugiert, um die Zellen abzutrennen. Die Konzentration an Lipase betrug nun ca. 10 000 Units pro ml. 25 ml dieser Fermenterlösung wurden mit 75 ml Wasser verdünnt und mit 1 g Accurel 1001 inkubiert. Die Endkonzentration an Lipase betrug 250000 Units pro g Accurel 1001. Es wurden 8,3 mg Lipase auf 1 g Accurel immobilisiert. Dasselbe Ergebnis wurde mit Accurel 1004 erzielt.

30

Beispiel 3: Polykondensation von organischen Siliciumverbindungen in Gegenwart von freier Lipase

Zu 25 ml Wasser enthaltend 50 000 Units freie Lipase aus *Burkholderia plantarii* (wäßrige Phase) wurden bei Raumtemperatur und Normaldruck 25 ml Phenyltriethoxysilan, $\text{Ph}(\text{EtO})_3\text{Si}$, (organische Phase) gegeben und unter starkem Rühren vermischt, wobei eine Emulsion entstand, und sich Silikat in Form eines weißen Niederschlages in der organischen Phase bildete. Nach 24 h wurden die beiden Phasen durch Zentrifugation getrennt. Die überstehende Lösung der organischen Phase wurde abgetrennt, und der zurückbleibende weiße Niederschlag über Nacht gegen 2 l Ethanol dialysiert. Das Ausschlußvolumen der Dialysemembran betrug 10000 Da. Nach 24 h wurde die Probe dem Dialysesack entnommen und durch Zentrifugation ein unlöslicher Niederschlag abgetrennt. Der Niederschlag wurde durch GPC analysiert. Als Eichsubstanz wurde Polystyrol verwendet. Die Molmasse der Polymeren des entstandenen Polykondensationsgemisches lag zwischen 800 und 2400 Da. Demnach wurden Polymere hergestellt, die aus 4 bis 40 Einheiten aufgebaut sind.

Figur 1 zeigt die Molmassenverteilung des Polykondensationsproduktes aus Beispiel 3.

20

Beispiel 4: Bestimmung der Molmasse über Gelpermeationschromatographie

20 µL einer Lösung mit 22 mg/ml (Gesamtprobe aus Beispiel 3) wurden entnommen und über Sartorius Minisart SRP 25 (0,2 µm) filtriert. Zur GPC wurde eine S 628-Säule eingesetzt mit einem Säuleninnendurchmesser von 4,6 mm und einer Länge von 25 cm. Als Trennmaterial wurde PL gel Mixed B [5 µm] eingesetzt. Die Trennung erfolgte bei einer Säulen-Temperatur von 30°C mit THF als Elutionsmittel und einer Durchflußgeschwindigkeit von 0,3 mL/min. Bei dieser Durchflußgeschwindigkeit hatte die Säule eine Bodenzahl von 7000. Die Ausschlußgrenze für Polystyrol lag bei ca. 10^7 . Als Detektoren wurden ein UV-Photometer HP 1100 VWD bei 254 nm sowie ein Verdampfungs-Lichtstreuendetektor ELS-1000 eingesetzt.

Die Kalibrierung erfolgte mit eng verteilten Polystyrol-Standards der Firma Polymer Laboratories mit Molmassen von 580 bis $7,5 \cdot 10^6$, sowie Hexylbenzol (Molmasse von 162). Ausserhalb dieses Intervalls liegende Elutionsbereiche wurden durch Extrapolation geschätzt. Die Ergebnisse sind Figur 1 zu entnehmen.

5

Beispiel 5: Polykondensation von organischen Siliciumverbindungen in Gegenwart von immobilisierter Lipase

- 10 Zu auf Accurel 1001 immobilisierter Lipase in wässriger Lösung wurde Tetrabutoxysilan gegeben und 3 Wochen bei Raumtemperatur stehen gelassen. Es bildeten sich kristalline Aufwachsungen auf dem Träger, und zwar an den Stellen, die mit Lipase belegt waren. In den Figuren 2 und 3 sind deutlich die kristallinen Aufwachsungen auf dem Träger zu erkennen.

15

Patentansprüche

5

1. Verfahren zur Polykondensation von organischen Siliciumverbindungen in Lösung bei pH-Werten zwischen 6 und 8 in Gegenwart eines Enzyms, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym eine Lipase ist.

10

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Lipase auf einem Träger immobilisiert ist.

15

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung Wasser und/oder eine Puffersubstanz enthält.

4. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung ein organisches Lösungsmittel enthält.

20

5. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Trägermaterial Polypropylen, Polystyrol und/oder Polyurethanschaumstoff enthält.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß eine Lipase aus Pseudomonas-Arten eingesetzt wird.

25

7. Verfahren nach Anspruch 1, 3 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß das entstandene Polykondensationsprodukt von der Lipase abgetrennt und durch Dialyse gereinigt wird.

30

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die organische Siliciumverbindung ausgewählt ist aus der Gruppe aus
- $(\text{RO})(\text{R}^1\text{O})(\text{R}^2\text{O})(\text{R}^3\text{O})\text{Si}$,
 - $(\text{RO})(\text{R}^1\text{O})(\text{R}^2\text{O})\text{SiR}^3$,
 - 5 - $(\text{RO})(\text{R}^1\text{O})\text{Si}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$ und
 - $(\text{RO})\text{SiR}^1\text{R}^2\text{R}^3$,
- mit R , R^1 , R^2 und R^3 , die unabhängig voneinander C_1 - bis C_{10} -Alkyl, C_3 - bis C_{10} -Cycloalkyl, C_4 - bis C_{20} -Alkylcycloalkyl, Aryl, C_6 - bis C_{16} -Alkylaryl sind, wobei die Alkylgruppen linear oder verzweigt sind.

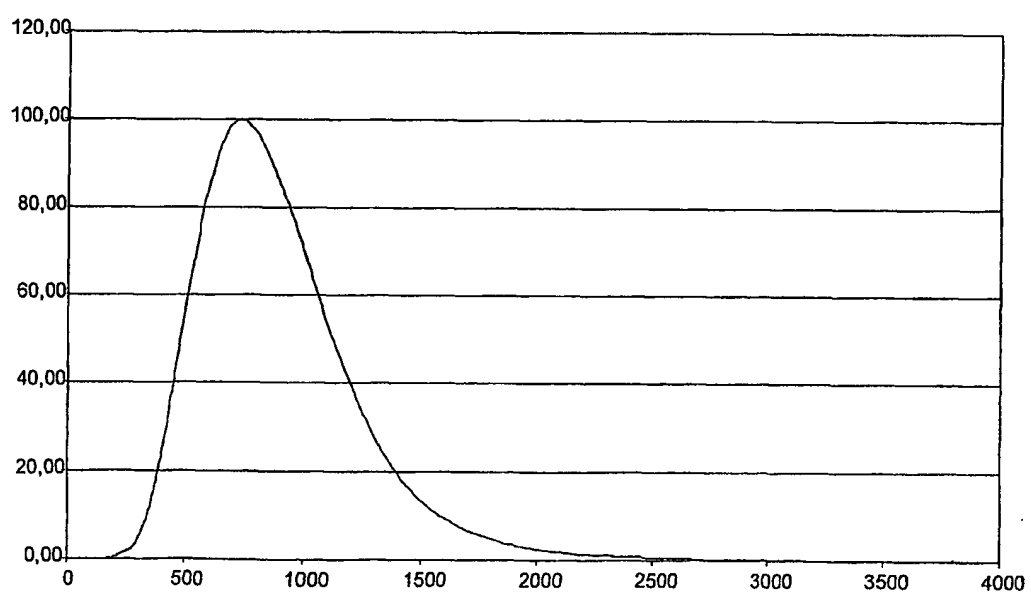


Fig. 1

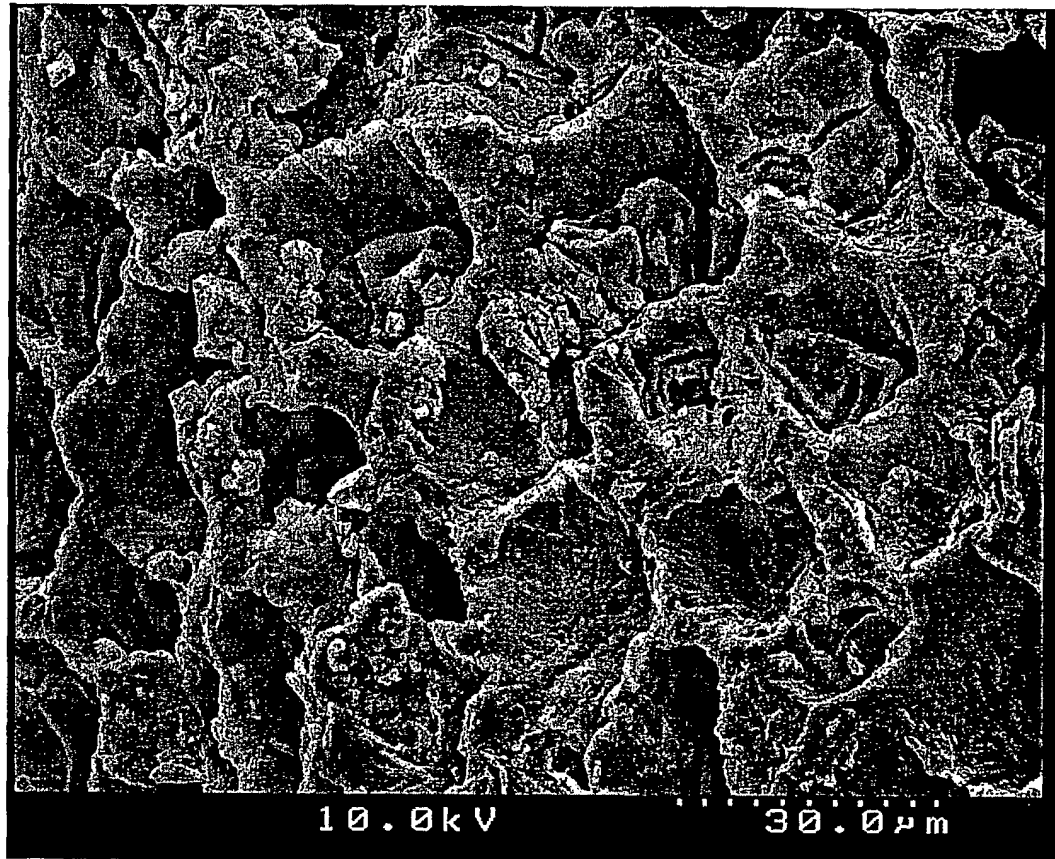


Fig. 2

BEST AVAILABLE COPY

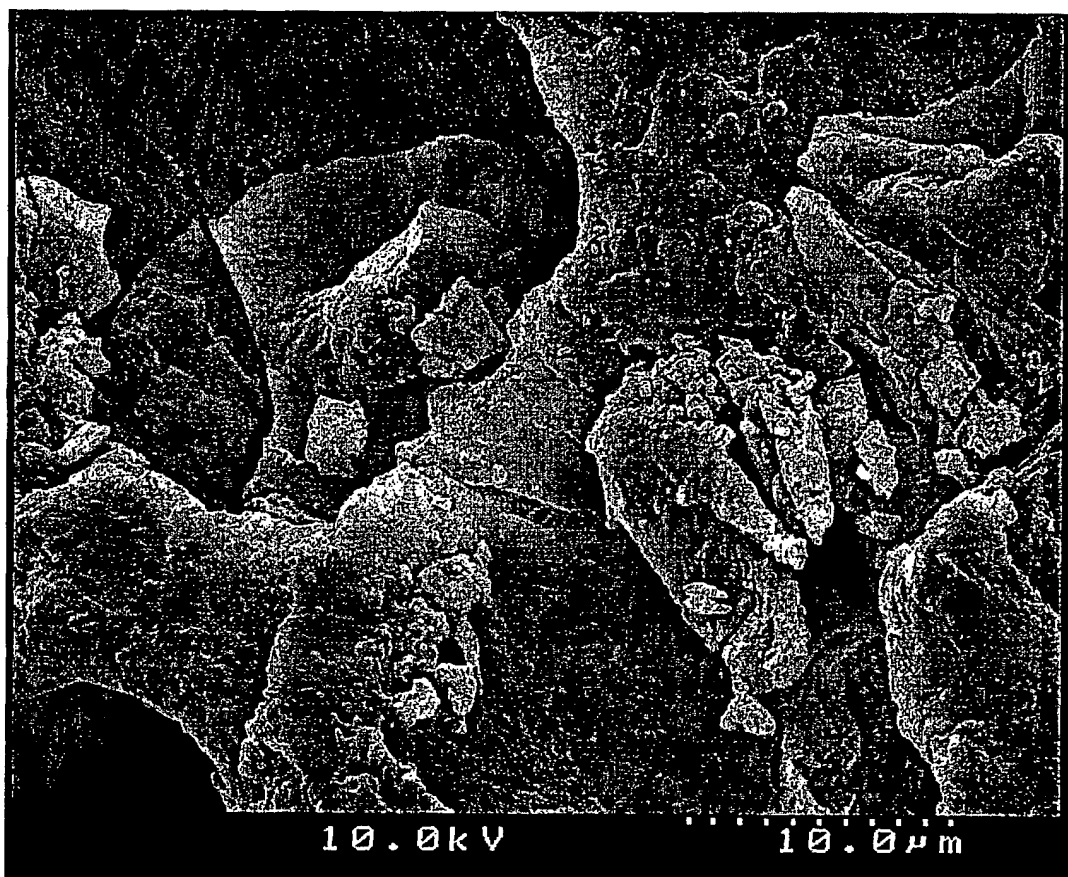


Fig. 3

BEST AVAILABLE COPY

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No

PCT/EP 01/10729

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 C12P9/00 //(C12P9/00,C12R1:38)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; QIU, SHUYI ET AL: "Lipase -catalyzed bioconversion of organosilyl alcohol in microaqueous phase" retrieved from STN Database accession no. 128:229390 XP002187002 abstract & HUANAN LIGONG DAXUE XUEBAO, ZIRAN KEXUEBAN (1997), 25(9), 51-54 ,</p>	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

A document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 January 2002

Date of mailing of the international search report

25/01/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Douschan, K

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/10729

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 C12P9/00 //(C12P9/00,C12R1:38)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; QIU, SHUYI ET AL: "Lipase -catalyzed bioconversion of organosilyl alcohol in microaqueous phase" retrieved from STN Database accession no. 128:229390 XP002187002 Zusammenfassung & HUANAN LIGONG DAXUE XUEBAO, ZIRAN KEXUEBAN (1997), 25(9), 51-54 , -----	1-8

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☐ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. Januar 2002

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

25/01/2002

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Douschan, K